

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-129298

⑪ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)6月11日

C 07 K 13/00
C 07 H 21/04
C 12 N 15/00
C 12 P 21/02

8318-4H
7306-4C
7115-4B
6712-4B

審査請求 未請求 発明の数 5 (全30頁)

⑭ 発明の名称 新規ポリペプチド

⑮ 特 願 昭60-269455

⑯ 出 願 昭60(1985)12月2日

⑰ 発 明 者	山 崎	達 美	東京都豊島区高田3丁目41番8号	中外製薬株式会社内
⑰ 発 明 者	山 本	修 己	東京都豊島区高田3丁目41番8号	中外製薬株式会社内
⑰ 発 明 者	平 田	裕 一	東京都豊島区高田3丁目41番8号	中外製薬株式会社内
⑰ 発 明 者	関 森	泰 男	東京都豊島区高田3丁目41番8号	中外製薬株式会社内
⑰ 発 明 者	長 田	重 一	東京都大田区多摩川2丁目24番62号	3号棟305号室
⑰ 出 願 人	中外製薬株式会社		東京都北区浮間5丁目5番1号	
⑰ 代 理 人	弁理士 野崎 てつ也			

明 細 書

1. 発明の名称

新規ポリペプチド

2. 特許請求の範囲

1 下記のアミノ酸配列で表わされるポリペプチド

(Met)n Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu
Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln
Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys
His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser
Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu
Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln
Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro
Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu
Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln
Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu
Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala
Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu

Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val
Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
(但しnは0又は1を示す)

2 ポリペプチドがヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のポリペプチド。

3 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクター。

4 遺伝子がショ糖密度勾配遠心法により15~17S画分として得られる、ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードするメッセンジャーRNAに相補的なDNAであることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の組換えベクター

5 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示されるポリペプチド配列またはその一部をコードするものである特許請求の範囲第3項記載の組換えベクター。

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys
 Leu Met Ala Leu Gln Leu Leu Leu Trp His Ser
 Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro Leu
 Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu
 Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln
 Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys
 Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
 Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp
 Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu
 Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala
 Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr
 Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe
 Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu
 Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly
 Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg
 Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu
 Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu
 Arg His Leu Ala Gln Pro

6 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有する

7 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有する
 ポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示され
 る塩基配列またはその一部を有するものである特
 許請求の範囲第3項記載の組換えベクター。

ATG GCT GGA CCT GCC ACC CAG AGC CCC ATG AAG
 CTG ATG GCC CTG CAG CTG CTG TGG CAC AGT
 GCA CTC TGG ACA GTG CAG GAA GCC ACC CCC CTG
 GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG
 CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG
 GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT
 GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG
 GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG
 GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC AGC CAG GCC CTG
 CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC
 GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC
 CTG GAA GGG ATC TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC
 TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT
 GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG
 GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG GGT
 GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC

ポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示され
 るポリペプチド配列またはその一部をコードする
 ものである特許請求の範囲第3項記載の組換えベ
 クター。

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln
 Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg
 Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu
 Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro
 Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly
 Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser
 Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln
 Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu
 Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu
 Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val
 Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met
 Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro
 Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
 Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala
 Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr
 Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

CGG GCA GGA GGG GTC CTA GTT GCC TCC CAT CTG
 CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA
 CGC CAC CTT GCC CAG CCC

8 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有する
 ポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示され
 る塩基配列またはその一部を有するものである特
 許請求の範囲第3項記載の組換えベクター。

ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG
 AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG
 AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG
 AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC
 GAG GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GGC
 ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC AGC
 CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA
 CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC
 CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATC TCC CCC GAG TTG
 GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC
 GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG
 GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC
 ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT

TTC CAG CGC CGG GCA GGA GGG GTC CTA GTT GCC
TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC
CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC

9 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が図4(A)に示される塩基配列またはその一部を有するものである特許請求の範囲第3項記載の組換えベクター。

10 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクターを含有する形質転換体。

11 ショ糖密度勾配遠心法により15~17S画分として得られる、ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードするメッセンジャーRNAに相補的なDNAであることを特徴とする特許請求の範囲第10項記載の形質転換体。

12 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示されるポリペプチド配列またはその一部をコードするものである特許請求の範囲第10項記載の形質転換体。

ポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示されるポリペプチド配列またはその一部をコードするものである特許請求の範囲第10項記載の形質転換体。

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln
Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg
Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu
Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro
Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly
Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser
Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln
Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu
Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu
Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met
Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro
Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala
Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr
Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys
Leu Met Ala Leu Gln Leu Leu Leu Trp His Ser
Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro Leu
Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu
Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln
Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys
Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp
Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu
Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala
Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr
Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe
Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu
Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly
Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg
Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu
Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu
Arg His Leu Ala Gln Pro

13 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有する

14 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示される塩基配列またはその一部を有するものである特許請求の範囲第10項記載の形質転換体。

ATG GCT GGA CCT GCC ACC CAG AGC CCC ATG AAG
CTG ATG GCC CTG CAG CTG CTG TGG CAC AGT
GCA CTC TGG ACA GTG CAG GAA GCC ACC CCC CTG
GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG
CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG
GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT
GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG
GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GCC ATC CCC TGG
GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC AGC CAG GCC CTG
CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC
GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC
CTG GAA GGG ATC TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC
TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT
GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG
GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG GGT
GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC

CGG GCA GGA GGG GTC CTA GTT GCC TCC CAT CTG
CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA
CGC CAC CTT GCC CAG CCC

15 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が以下に示される塩基配列またはその一部を有するものである特許請求の範囲第10項記載の形質転換体。

ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG
AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG
AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG
AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC
GAG GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GGC
ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC AGC
CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA
CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC
CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATC TCC CCC GAG TTG
GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC
GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG
GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC
ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT

的因子(以下「CSF」と略記する)活性を有するポリペプチドに関し、且つ該ポリペプチドをコードする遺伝子を組み込んだ組換えベクター並びに、これを含む形質転換体、及びそれから産生されるCSF組成物に関する。

(従来の技術)

2層軟寒天培養法で、上層に標的細胞として骨髄細胞を、下層に腎細胞や胎児細胞を入れて培養すると、上層の細胞の一部が増殖分化し、好中球系顆粒球(以下「顆粒球(granulocyte)」と称す。)や単球マクロファージからなるコロニーが形成されることから、生体内にコロニー形成を促進する因子が存在することが知られていた(PluznikとSach: J. Cell. Comp. Physiol., 66巻 319頁(1965), BradleyとMetcalf: Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 44巻287頁(1966))。

CSFと総称されるこの因子は、正常に広く生体内分布する細胞、たとえば、T細胞、単球マクロファージ、繊維芽細胞、内皮細胞などより産生

TTC CAG CGC CGG GCA GGA GGG GTC CTA GTT GCC
TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC
CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC

16 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が図4(A)に示される塩基配列またはその一部を有するものである特許請求の範囲第10項記載の形質転換体。

17 ヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクターを含有する形質転換体から産生されたヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチド組成物。

18 図4(B)(II)に示されるアミノ酸配列の一部で表わされるヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチド。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なポリペプチド、特に主としてヒト顆粒球系細胞のコロニー形成をさせるために必要な、特異的な刺激因子、すなわちコロニー刺激

されることが知られている。CSFには顆粒球・単球マクロファージの幹細胞に作用して、その増殖を刺激し分化を誘導して、軟寒天中で顆粒球や単球マクロファージから成るコロニーを形成させる作用をもつ顆粒球-単球マクロファージCSF(GM-CSFと略記する。)、主として単球マクロファージのコロニーを形成させる作用をもつ単球マクロファージCSF(M-CSFと略記する。)、より未分化な多能性幹細胞に作用する多能性CSF(multi-CSFと略記する。)、あるいは本発明の如き、主として顆粒球系コロニーを形成させる作用をもつ顆粒球CSF(G-CSFと略記する。)などのサブクラスが存在し、それぞれのサブクラスによって標的細胞の分化段階も異なることが考えられる様になってきた[Asano:代謝-Metabolism and Disease, 22巻 249頁(1985), Yunis等: "Growth and Maturation Factors", edited by Guroff, John Wiley & Sons, NY, 1巻, 209頁(1983)]。従って個々のサブクラスを精製し、その化学的

性状や生物学的性状をより詳細に調べることは造血機構や種々の血液学的疾患の病態の解析にきわめて重要なことである。中でもG-CSFの生物学的作用として、骨髄性白血病細胞の分化誘導と成熟顆粒球の機能亢進が注目されており、特に白血病の治療と予防へのG-CSFの臨床的有用性が大いに期待されている。

(発明が解決しようとする問題点)

G-CSFの単離精製のために従来行われてきた試みは、細胞培養法を用いて、その培養上清からG-CSFを単離する方法であるが、G-CSFが低濃度しか産生されないこと、大量の培養液から微量のG-CSFを得るには複雑な精製過程を必要とするなどの難点をかかえ未だ大量の均一なG-CSFを得るには至っていない。従って、組換えDNA技術を用いてG-CSFを大量に製造することが渴望されていた。

(問題点を解決するための手段)

本発明は特許請求の範囲第1項に記載したアミノ酸配列で表わされるヒト顆粒球コロニー刺激因

子活性を有するポリペプチドを提供するものである。又該ポリペプチドを産生するために用いられる組換えベクター、及びこれで宿主を形質転換体して得た形質転換体とそれから産生されるG-CSF組成物も同時に提供するものである。

なお、本発明にとり特に重要な構成要件はヒトG-CSF活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であって、詳しくはショ糖密度勾配遠心法により15~17S画分として得られる、ヒトG-CSF活性を有するポリペプチドをコードするメッセンジャーRNA(mRNA)に相補的なDNA(cDNA)であり、より詳しくは図4(B)のポリペプチドI又はIIをコードする遺伝子あるいはその一部を有するものであり、さらに詳細には図4(A)の塩基配列の5'-末端から31~33ヌクレオチド位のATGから640~642ヌクレオチド位のCCCまでの配列、121~123位のACCから640~642位のCCCまでの配列または図4(A)に記載された配列あるいはその一部を有するものである。

本発明の遺伝子は例えばG-CSF活性を有するポリペプチドを産生する能力を有する哺乳動物細胞等からG-CSFをコードするmRNAを調製した後、既知の方法により2本鎖cDNAに変換することによって得られる。

前記、mRNAの供給源となる哺乳動物細胞は本発明においては、ヒト口腔底癌由来の細胞株C1U-2(Collection Nationale De Cultures De Microorganismes(C. N. C. M)寄託番号I-483)であるが、腫瘍細胞株にかぎらず、哺乳動物から分離できる細胞、あるいは樹立した他の細胞株でもよい。又、mRNAの調製はすでに他のいくつかの生理活性タンパクの遺伝子をクローン化する際、用いられた方法、例えば、バナジウム複合体等のリボヌクレアーゼインヒビター存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行う(BergerとBirkenmeier: Biochemistry 18巻5143頁(1979)を参照)か、グアニジンチオシアナート処理後、CsCl密度勾配遠心を行う(Chirgwin等: Biochemistry 18巻5294頁(1979)を参照)ことによって、全

RNAを得た後、オリゴ(dT)-セルロースやセファロース2Bを担体とするポリU-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法あるいはバッチ法によりポリ(A⁺)RNA(mRNA)を得ることができる。またショ糖密度勾配遠心法等によりポリ(A⁺)RNAを更に分画することもできる。

上記の如くして得られたmRNAが、G-CSF活性をもつポリペプチドをコードするものであることを確認するためには、mRNAをタンパク質に翻訳させ、生理活性を調べるか、抗G-CSF抗体を用いてそのタンパクを同定する等の方法を行えばよい。例えば、アフリカツメガエル(Xenopus laevis)の卵母細胞にmRNAを注入して翻訳せたり(Gurdon等: Nature, 233巻177頁(1972)を参照)、あるいはウサギ網状赤血球(Reticulocyte)系や小麦胚芽(Wheat germ)系を利用した翻訳反応が行われている(SchleifとWensink: "Practical Methods in Molecular Biology", Springer-Verlag, N.Y., (1981))。

G-CSF活性の検定は骨髓細胞を用いた軟寒天培養法を適用して実施できる。それらの手法については総説がある(Hetcalf: "Hemopoietic Colonies", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY(1977))。

前述の如き方法で得たmRNAを鋳型にして1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成し、適当なベクターDNAとの組換えプラスミドを作成する。これを大腸菌(*Escherichia coli*)などを形質転換して、形質転換株のDNA群(以下、cDNAライブラリーと称する。)を得る。

mRNAから2本鎖cDNAを得るには、例えばmRNAの3'-末端にあるポリA-鎖に相補的なオリゴ(dT)をプライマーとして逆転写酵素で処理するか、またはG-CSFタンパクのアミノ酸配列の一部に相応するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして逆転写酵素で処理してmRNAに相補的なcDNAを合成する。2本鎖cDNAは、アルカリ処理でmRNAを分

解・除去した後、得られた1本鎖cDNAを逆転写酵素又はDNAポリメラーゼ(例えばKlenow断片等)処理後S1ヌクレアーゼ等で処理して得るか、あるいは、直接RNase HおよびDNAポリメラーゼ(例えば、大腸菌のDNAポリメラーゼI等)等で処理することによっても得ることができる(例えば、Maniatis等: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982)およびGublerとHoffman: Gene25巻 263頁(1983)を参照)。

このようにして得られた2本鎖cDNAを適当なベクター、例えば、pSC101, pDF41, ColE1, pMB9, pBR322, pBR327, pACYC1などに代表されるEK型プラスミドベクターや、 λ gt1, λ c, λ gt10, λ gtWESなどに代表されるファージベクターなどに組み込んだ後、大腸菌(X1776: HB 101: DH1, C600株など)等を形質転換してcDNAライブラリーを得ることができる(例えば、前出 "Molecular cloning" を参照)。

2本鎖cDNAをベクターと連結させるには、DNA末端に連結可能な末端をつけるべく、適当な化学合成DNA断片を追加し、予め制限酵素を用いて開裂させたベクターDNAとATP存在下にT4 ファージDNAリガーゼで処理することにより行うことができる。あるいは、予め制限酵素を用いて開裂させたベクターDNAと2本鎖cDNAのそれぞれにdG, dC-鎖(あるいはdA, dT-鎖)を付加した後、例えば両DNAを含む溶液を徐冷することによっても行うことができる(前記Molecular cloning を参照)。

こうして得られた組換えDNA体による宿主細胞の形質転換は、例えば宿主細胞が大腸菌の場合Hanahan が詳細に記述している如き方法(J. Mol. Biol.; 166巻 557頁(1983))、すなわち、CaCl₂やMgCl₂又はRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に該組換えDNA体を加えることにより実施することができる。

目的とする遺伝子を保有する細胞を検索するには、インターフェロンcDNAのクローン化で用

いられたプラスマイナス法(Taniguchi 等: Proc. Jpn. Acad. 55巻 Ser. B, 464頁(1979))や、ハイブリダイゼーション・トランスレーションアッセイ法(Nagata等: Nature 284巻 316頁(1980))など、又は該タンパク質のアミノ酸配列をもとにして化学合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いたコロニーあるいはブラークハイブリダイゼーション法(Wallace 等: Nucleic Acids Res., 9巻 879頁(1981))などを用いればよい。

このようにしてクローン化されたヒトG-CSF活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む断片は適当なベクターDNAに再び組み込むことにより、他の原核生物または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。更にこれらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現に係る配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞に於いて遺伝子を発現させることが可能である。

原核生物宿主細胞としては、例えば*Escherichia*

coli, Bacillus subtilis, Bacillus thermophilus 等が挙げられる。目的の遺伝子をこれ等の宿主細胞内で形質発現させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起源および調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させればよい。またベクターは形質転換細胞に表現形質(表現型)の選択性を付与することができる配列をもつものが望ましい。

例えば、E. coliは、それを宿主とするベクターであるpBR322を用いて形質転換することができる(Boliver等; Gene 2巻95頁(1975)を参照)。pBR322はアンピシリンおよびテトラサイクリン耐性の遺伝子を含んでおり、どちらかの耐性を利用することによって形質転換細胞を同定することができる。原核生物宿主の遺伝子発現に必要なプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼ遺伝子のプロモーター(Chang等; Nature 275巻615頁(1978))、ヤラクトースプロモーター(Goeddel等; Nature 281巻544頁(1979)を参照。)およびトリプトファンプロモーター(Goeddel等;

Nucleic Acid Res.) 8巻4057頁(1980)を参照)等があげられ、どのプロモーターも本発明のヒトG-CSF活性をもつポリペプチドの産生に使用することができる。

以上の如き宿主-ベクター系を用いてヒトG-CSF活性を有するポリペプチドを得るには、上記ベクターの適当な部位に該遺伝子を組み込んだ組換えDNA体により宿主細胞を形質転換させた後、得られた形質転換体を培養すればよい。さらに細胞内または培養液から該ポリペプチドを分離・精製するには、公知の手段を用いて行うことができる。

一般に真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子等で知られているように、多形現象(polymorphysm)を示すと考えられ(例えばNishi等; J. Biochem. 97巻153頁(1985)を参照)、この多形現象によって1個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば、塩基配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

また図4(B)アミノ酸配列の中の1個またはそれ以上のアミノ酸を欠くか又は付加されたポリペプチド、あるいは1個またはそれ以上のアミノ酸が1個またはそれ以上のアミノ酸で置換されたポリペプチドでもG-CSF活性を有することがある。例えば、ヒトインターロイキン2(IL-2)遺伝子のシステインに相当する塩基配列をセリンに相当する塩基配列に変換して得られたポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することもすでに公知となっている(Wang等; Science, 224巻1431頁(1984))。それゆえ、それ等天然に存在するかあるいは人工合成されたポリペプチドがヒトG-CSF活性を有する限りそれ等のポリペプチドをコードする遺伝子は全て本発明に含まれる。

本発明のヒトG-CSF活性をもつポリペプチド、及びこれをコードする遺伝子を有する組換えベクター及びこれを有する形質転換体、さらにはその発現ヒトG-CSF組成物を得る方法について簡単に説明すると以下の通りである。

(1) プロープの調製

腫瘍細胞株CHU-2の培養上清から精製して得られた均一ヒトCSF・タンパクについてN末端よりアミノ酸配列を決定し、さらにプロムシアン分解、トリプシン処理などにより断片化した後その断片についてもアミノ酸配列を決定した。

【実施例3(i), (ii), (iii)】

そのアミノ酸配列中から図1に示される配列に対応する3種類のヌクレオチドプロープ(A)、プロープ(LC)およびプロープ(IWQ)を合成した。(実施例4)プロープ(A)は連続した14個のヌクレオチドからなる混合型プロープである。

プロープ(IWQ)は、ヒトコレシストキニン遺伝子のクローン化で用いられた如き(Takahashi等; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82巻1931頁(1985))デオキシイノシンを使用した30個の連続したヌクレオチドである。プロープ(LC)は実施例3(i)に示したアミノ酸配列のN末端から32~39番に相当する部分を、図3に示した塩基配列を基にして合成した24個のヌクレオチドからな

るプローブである。

ヌクレオチドの化学合成は改良型ホスホトリエステル法を固相法に適用して行うことができ、Marangの総説に記述されている(Tetrahedron 39巻3-22頁(1983))が市販の自動合成装置(例えばApplied Biosystem 社製)を用いても行うことができる。

使用するプローブは、本発明で用いたプローブ以外の位置のアミノ酸配列に基づくものであってよい。

(2) cDNAライブラリーの構築

CHU-2細胞にグアニジンチオシアナート溶液を加えてホモジナイズし、CsCl密度勾配遠心法により全RNAを得る。

この全RNAからオリゴ(dT)セルロースカラムによりポリ(A⁺) RNAを選別した後、逆転写酵素により1本鎖cDNAを合成し、RNase HおよびE. coli DNAポリメラーゼIを加えて、2本鎖cDNAを得た。得られた2本鎖cDNAにdC鎖を付加し、Pst I切断部位にdG鎖を付

加したpBR322ベクターとつなぎ合せて、大腸菌X1776株を形質転換させ、pBR322系cDNAライブラリーを構築した。(実施例5、6)

同様に、EcoRIリンカーを用いて、2本鎖cDNAをλgt10ベクターと連結し、λファージ系cDNAライブラリーを構築した。(実施例7)

(3) スクリーニング

pBR322系cDNAライブラリー由来の組換え体をワットマン541濾紙に固定し、³²Pで放射線標識したプローブ(IWQ)を用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行った結果、1個のクローンが選別できた。このクローンを、サザンブロットリング法(Southern; J. Mol. Biol. 98巻503頁(1975))を用いて更に詳細に検討したところ、プローブ(A)ともハイブリダイズした。

このクローンの塩基配列をジデオキシ法(Sanger; Science 214巻1205頁(1981))によって決定した。

得られたcDNAインサートの塩基配列を図2

に示す。図2に示される如く、このcDNAインサートはプローブ(IWQ)およびプローブ(A)を含む308塩基対からなり、実施例3(iii)に示したアミノ酸配列を含む83個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレームを有していることがわかった。

この308塩基対を含むpBR322由来のプラスミドを以下pHCS-1と略記する。(実施例8)

pHCS-1から得られる308塩基対を含むDNA断片をニックトランスレーション法(前出、Molecular Cloningを参照)にて放射線標識し、これをプローブとしてλgt10由来のcDNAライブラリーをブランクハイブリダイゼーション(BentonとDavis; Science 196巻180頁(1977))によりスクリーニングして5個のクローンを得、cDNAを含むと思われるクローンについてその塩基配列を前述と同様の方法で決定した。(図3)

図3に示される如く、このcDNAインサートは一つの大きなオープンリーディングフレームを有する。

このcDNAによってコードされるアミノ酸配列は図3に示された如く読み取ることができる。

EcoRI切断部位にこのcDNAを挿入した、pBR322を保持するエシエリヒア・コリ(E. coli) X1776株は、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(FERM寄託番号P-8352)。また、このcDNAをpBR322

[Soberon等; Gene 9巻287頁(1980)]とEcoRI部位で結合したプラスミドをpBRG4と称する。

このようにして得られたpBRG4を、制限酵素EcoRIで処理して得られる約1500塩基対のcDNAを含むDNA断片をニックトランスレーション法(前出のMolecular cloningを参照)にて放射線標識し、これをプローブとして、再びλgt10由来のcDNAライブラリーをブランクハイブリダイゼーション(前出BentonとDavisの文献参照)によりスクリーニングした。この際、同時にλファージDNAを固定したニトロセルロース濾紙を2枚作成しておき、先に述べたプローブ(IC)にて同様のブランクハイブリダイゼーションを行

い、両プローブでポジティブとなるファージを選別した。完全長と思われるクローンを選別し、ジデオキシ法を用いてcDNAインサートの塩基配列を決定したところ図4(A)に示される如くであった。

このcDNAは一つの大きなオープンリーディングフレームを有し、コードされるアミノ酸配列は図4(A)に示された如く演えきである。

実施例3(i)に示されているG-CSFタンパクのN末端アミノ酸配列との比較により、本cDNAは5'-末端から31~33ヌクレオチド位のATG配列から始まり、118~120位のGCC配列で終わる90塩基対によってコードされるシグナルペプチドおよび121~123位のACC配列から始まり640~642位のCCC配列で終る522塩基対によってコードされる成熟G-CSFポリペプチドに相当する塩基配列を含んでいることがわかった。従って図4(B)に示されたアミノ酸配列Iのポリペプチドは204個のアミノ酸からなり、その分子量は21977.35ダルトンと計算された。同様にア

ミノ酸配列IIのポリペプチドは174個のアミノ酸からなり、その分子量は18671.42ダルトンであった。(実施例10)

但しタンパク質の開始部位に関しては、31~33位以外に58~60位あるいは67~69位のATGも同様に考え得る。

EcoRI切断部位に本cDNAを挿入したpBR327を保持するエシェリヒア・コリ(E. coli) X1776株は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(FERM寄託番号P-8453)。

図5には、得られた遺伝子の制限酵素切断部位を示した。

(4) 組換えベクターの構築

かくして得られたpBRV2プラスミド(実施例10)からG-CSFポリペプチドのcDNA断片を制限酵素により切り出して来て、これと

① tacプロモーターを含有するpKK 223-3(ファルマシア社製)から調製した断片とアニーリングした合成リンカーを連結(ライゲーション)し組換えベクターを構築するか(実施例11)

② P_Lプロモーターを含むpPL-lambda(ファルマシア社製)から調製した3種の断片とアニーリングした合成リンカーを連結し、再調整して組換えベクターを構築するか(実施例12)

③ あるいはtrpプロモーター含有pOYIプラスミドから調製した断片とアニーリングした合成リンカーを連結して組換えベクターを構築する。(実施例13)

(5) 形質転換体の調製と培養、発現

次に上記3種の組換えベクターを用いて前出のMolecular Cloningに記載されている塩化カルシウム法又は塩化ルビジウム法で、夫々E. coli DH1株、E. coli N4830株、あるいはE. coli JM105株を形質転換した。(実施例11, 12, 13)

得られた形質転換株をアンピシリン含有ルリア(Luria)培地でまず培養し次いで必要に応じて、適宜誘導をかけ、培養を行い形質発現せしめた。(実施例14)

(6) 大腸菌からのG-CSFポリペプチドの回収精製とアミノ酸分析

形質転換株の培養液を遠心にかけ集菌した後リゾチーム処理をし、凍結-融解をくりかえし菌菌させる。次いで塩酸グアニジン処理後遠心で上澄液を得る。

これをUltrogel ACA54カラム(LKB社製)でゲル濾過し、活性画分を限外濾過器で濃縮した。

次に、nプロパノールを含むトリフルオロ酢酸水溶液を添加し、水中放置、遠心分離し、逆相C18カラムに吸着、溶出操作を施す。溶出後各画分の活性を調べ、活性ピークを集め凍結乾燥した。この凍結乾燥粉末を溶解し高速液体クロマトグラフィにかけ、再度上記と同様の精製操作を行い取得したポリペプチドをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ目的とするG-CSFポリペプチドを示す単一のバンドを確認した。(実施例15)

このようにして得られたポリペプチドはヒトG-CSF活性を示した。(実施例16)

更に、得られた精製G-CSFポリペプチドのアミノ酸分析はアミノ酸組成を日立835アミノ酸

自動分析装置（日立製作所製）を使用し、特殊アミノ酸分析法によって分析した。又、N末端アミノ酸分析は気相式シーケンサーを用いてエドマン分解し、高速液体クロマトグラフィー及び、Ultrasphere - ODSカラムを用いて行った。

（実施例17）

（実施例）

以下実施例をあげて本発明を詳細に説明するが、その前にCSF活性の測定法について参考例で説明しておく。

<参考例> CSF活性の測定方法

本発明において用いられたCSF活性（以下CSAと略す）の測定方法は次のとおりである。

「CSAの測定方法」

（a）ヒト骨髓細胞を用いる場合：

Bradley T. R., Metcalf D. 等の方法

（Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 44巻 287～300頁、1966年）に準じて単回軟寒天培養法により行った。すなわちウシ胎児血清 0.2ml、被検検体 0.1ml、ヒト骨髓非付着性細胞浮遊液 0.1ml

めた。

尚、上記（a）、（b）の方法において用いた「改変 McCoy's 5A培養液および（a）で用いたヒト骨髓非付着性細胞浮遊液は次の如くして作成した。

「改変 McCoy's 5A培養液（2倍濃度）」

McCoy's 5A培養液（GIBCO社製）12g、MEMアミノ酸ビタミン培地（白水製薬社製）2.55g、重炭酸ナトリウム 2.18g、ペニシリン Gカリウム 50000単位を2回蒸留水 500mlに溶解後、0.22 μ mのミリポアフィルターにて濾過滅菌を行った。

「ヒト骨髓非付着性細胞浮遊液」

健康人胸骨せん刺により得た骨髓液をRPMI 1640培養液にて5倍に希釈し、Ficol - Paque 液（ファルマシア社製）に重懸し、400×g、30分、25℃にて遠心を行い、界面の細胞懸（比重<1.077）を回収する。この細胞を洗浄後、20%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培養液にて 5×10^6 cell/mlの濃度に調整し、25mlの組織培養用プラスチックフラスコに入れ、炭酸ガス培養器に

（ $1 \sim 2 \times 10^5$ 有核細胞）、改変 McCoy's 5A培養液 0.2ml、寒天を0.75%含む改変 McCoy's 5A培養液 0.4mlを混合して直径35mmの組織培養プラスチックディッシュに入れて固まらせたのち、37℃、5%炭酸ガス/95%空気、100%湿度の条件で培養を行い、10日後に形成されたコロニー数（50個以上の細胞からなる集落を1コロニーとする）を数え、1個のコロニーを形成する活性を1単位（Unit）としてCSAを求めた。

（b）マウス骨髓細胞を用いる場合：

ウマ血清 0.4ml、被検検体 0.1ml、C3H/He（メス）マウスの骨髓細胞浮遊液 0.1ml（ $0.5 \sim 1 \times 10^5$ 有核細胞）、寒天を0.75%含む改変 McCoy's 5A培養液 0.4mlを混合し直径35mmの組織培養用プラスチックディッシュに入れて固まらせたのち、37℃、5%炭酸ガス/95%空気、100%湿度の条件下にて5日間培養し、形成されたコロニー数（50個以上の細胞からなる集落を1コロニーとする）を数え、1個のコロニーを形成する活性を1単位（Unit）としてCSAを求

て30日間インキュベートしたのち、上清の非付着性細胞を回収し、再度25mlプラスチックフラスコに入れ、2時間30分インキュベートしたのち、上清の非付着性細胞を集めて用いた。

実施例 1. 「CHU-2」の樹立

著明な好中球の増多が認められた口腔底癌患者の腫瘍をnu/nuマウスに移植した。この腫瘍は移植約10日後に著明な腫瘍の増大と好中球の増多が認められた。この腫瘍を移植12日後に無菌的に摘出し、1～2mm³角に細切し、これを以下の如く培養した。

上記細切した腫瘍塊10～15片を50mlのプラスチック遠心管に入れ、5mlのトリプシン溶液（トリプシン 0.25%、EDTA 0.02%含む）を加え、37℃の温浴中で10分間振とうしたのち上清を捨て、再度、同トリプシン溶液5mlを加え、37℃で15分間攪拌しながらトリプシン消化を行った。上清の細胞浮遊液を回収し、ウシ胎児血清を1ml加えてトリプシンの作用を止めたのち水中に保存した。

以上の操作を再度行い細胞浮遊液を回収し、前

回の分と合わせて 1,500r.p.m. 10分間の遠心により細胞ペレットを得た。この細胞ペレットをウシ胎児血清を10%含むF-10にて2回洗浄したのち、25 cm^2 のプラスチック培養フラスコに細胞濃度 5×10^6 個/フラスコになるようにして植え込んだ。ウシ胎児血清を10%含有するF-10培養液を用い、炭酸ガスインキュベーター（炭酸ガス濃度5%、湿度100%）中に一晩インキュベートしたのち、上清を非付着細胞と共に除去し、新しい培養液を加えて培養を継続した。培養開始後6日目に細胞がいっぱいに増殖したので、この時点で培養液を新しいものに替えた。翌日、この培養液を捨て、RPMI 1640で5倍希釈した抗マウス赤血球抗体（CappeI社製）2 ml と同じくRPMI 1640で2.5倍希釈したモルモット補体（極東製薬社製）2 ml を加え37 $^{\circ}\text{C}$ 、20分間インキュベートした。インキュベーション終了後ウシ胎児血清を10%含むF-10にて2回洗浄しn.u/n.uマウス由来のフィブロブラストを除去し、引き続きウシ胎児血清を10%含むF-10培養液を加えて、さらに2日間

培養を行った後細胞の一部を取り出し、限界希釈法によりクローニングを行った。

得られた11コのクローンについてCSF活性を調べたところ、他のものよりも約10倍高い活性を示すクローン（CHU-2）が得られた。

実施例 2. CSFの単離

上述の如くして樹立された細胞が完全に密に増殖した150 cm^2 の培養フラスコ2本より細胞を回収し、これをウシ胎児血清を10%含有するF-10培養液500 ml に浮遊したのち、1580 cm^2 のガラス製ローラーボトル（Beico社製）に移し、0.5 r.p.m.の速度で回転培養を行った。細胞がローラーボトルの内壁に完全に密に増殖した時点で培養液を血清を含まないRPMI 1640に交換し、4日間培養したのち培養上清を回収し、ウシ胎児血清を10%含有するF-10を加えて培養を続行する。3日間培養したのち再び血清を含まないRPMI 1640に液替を行い、4日後に培養上清を回収した。以下同様の操作をくり返すことにより、毎週1ボトルより500 ml ずつの血清を含まない培養上清が

得られ、しかもこの方法によりかなり長期間にわたって細胞を維持し、培養上清を回収することが可能であった。

得られた培養上清5lを1バッチとし、これに0.01% Tween 20を添加後Hollow Fiber DC-4およびAmicon PM-10（アコン社製）を用いた限外濾過法により約1000倍に濃縮したのち、これを以下の順序で精製した。

(i) 直径4.6 cm 、長さ90 cm のUltrogel ACA 54カラム（LKB社製）を用い、0.15 M NaClおよび0.01% Tween 20（半井化学社製）を含む0.01 M トリス塩酸緩衝液（pH 7.4）を用いて前記濃縮した培養上清5 ml を流速約50 ml /時間でゲル濾過した。尚カラムはあらかじめウシ血清アルブミン（分子量67,000）、オボアルブミン（分子量45,000）、チトクロームC（分子量12,400）にてキャリブレーションを行った。ゲル濾過終了後各フラクションより0.1 ml ずつを採取し、10倍に希釈した後、前述した「CSAの測定方法(b)」により活性を示す画分を調べた。こ

の結果、先ず $V_e = 400 \sim 700\text{ml}$ の画分がマクロファージ部位のCSAを示し、 $V_e = 800 \sim 1200\text{ml}$ の画分が顆粒球部位のCSAを示すことがわかったので、後者の画分を集めPM-10（アミコン社製）を用いる限外濾過器によって約5 ml に濃縮した。

(ii) 上記濃縮画分にn-プロパノール（東京化成社製、アミノ酸配列決定用）を30%含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を添加し、氷中に15分程度放置したのち、15,000r.p.m. 10分間の遠心により沈澱を除去した。次いで先のn-プロパノールおよびトリフルオロ酢酸を含む水溶液で平衡化した μ Bondapak C18カラム（Waters社製、セミ分取用、8 $\text{mm} \times 30\text{cm}$ ）に吸着後、30~60%の直線濃度勾配のn-プロパノールを含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液で順次溶出した。高速液体クロマト装置は日立685-50型を、検出は日立638-41型検出器（いずれも日立製作所製）を用い、220 nm と280 nm の吸収を同時に測定した。溶出後、各画分より10 μ lを分取100倍希釈したの

ち、前述の「CSAの測定法(b)」により活性を示す画分を調べた。この結果、n-プロパノール40%にて溶出されるピークに活性が認められたので、このピークを集め再度同じ条件で再クロマトを行い上記と同様にしてCSAを調べたところ、やはりn-プロパノール40%の位置のピークに活性が認められたので、このピークを集め(4フラクション=4ml)凍結乾燥した。

(iii) 上記凍結乾燥粉末をn-プロパノールを40%含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液200μlに溶解し、TSK-G3000SWカラム(東洋曹達社製、7.5mm×60cm)を用いた高速液体クロマトグラフィ(HPLC)にかけた。溶出は同水溶液により0.4ml/分の流速で行い、フラクションコレクターFRAC-100(ファルマシア社製)により0.4mlずつ分取した。分取した各画分についてCSAを前記と同様にして調べた結果、保持時間が37~38分の画分(分子量約2万に相当)に活性が認められたので、この画分を回収し、更に分析用μ Bondapak C18カラム(4.6mm×30cm)に

よる精製を施したのち、メインピークを回収し凍結乾燥した。得られた標品について前述の「CSAの測定方法(a)」によって検定したところヒトG-CSF活性を有することを認めた。

実施例 3. アミノ酸配列の決定

(i) N末端アミノ酸配列の決定

試料を気相式シーケンサー(アプライドバイオシステム社製)を用いてエドマン(Edman)分解し、得られたPTHアミノ酸を高速液体クロマトグラフィ装置(ベックマン・インストルメンツ社製)およびUltrophere-ODSカラム(ベックマン・インストルメンツ社製)を用いて常法により分析した。カラム(5μm、直径4.6mm、長さ250mm)を開始緩衝液(15mM酢酸ナトリウム緩衝液pH 4.5、40%アセトニトリルを含む水溶液)にて平衡化したのち、検体(20μlの開始緩衝液にて溶解)を注入して開始緩衝液によるイソクラティック溶出により分離を行った。流速は1.4ml/分、カラム温度は40℃に保持した。PTHアミノ酸の検出は269nmと320nmの紫外部吸収を

利用した。あらかじめ標準PTHアミノ酸(シグマ社製)各2nmolを同一の系で分離して保持時間を決定し、被検検体の保持時間から同定を行った。この結果、N末端から40残基目までのアミノ酸配列は次の如く決定された。

H₂N-Thr-Pro-Leu-Gly-
Pro-Ala-Ser-Ser-Leu-
(10)
Pro-Gln-Ser-Phe-Leu-
Leu-Lys-Cys-Leu-Glu-
(20)
Gln-Val-Arg-Lys-Ile-
Gln-Gly-Asp-Gly-Ala-
(30)
Ala-Leu-Gln-Glu-Lys-
Leu-Cys-Ala-Thr-Tyr-
(40)
Lys-

(ii) プロムシアン分解

試料を70%ギ酸に溶かし、昇華精製したプロムシアン200当量を加えて、37℃で一夜反応させた。次に反応物を凍結乾燥後、TSK G3000SWカラム(東洋曹達社製)を用いたHPLCで画分し4つのピークを得た。ピークを分子量の大きい順

にCN-1、CN-2、CN-3、CN-4と命名し、収率のよいCN-1、CN-2についてアミノ酸配列を自動気相式シーケンサー(アプライドバイオシステム社製)を用いて(i)と同様の条件で分析した。

その結果、CN-1はG-CSFタンパクのN末端からのペプチドであることがわかった。さらにCN-2は以下のアミノ酸配列を有していた。

Pro-Ala-Phe-Ala-Ser-
Ala-Phe-Gln-Arg-Arg-
Ala-Gly-Gly-Val-Leu-
Val-Ala-Ser-His-Leu-
Gln-

(iii) トリアシン分解

試料を8M尿素を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)に溶かし、0.1%2-メルカプトエタノールを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)を加えて最終的に2Mの尿素となるように調整した。次いで試料と酵素が50:1となるようにTPCK処理トリアシン(シグマ社製商品名)を加え、25

で4時間反応させた後、さらに同量のTPCK処理トリプシンを加えて、再度25℃で16時間反応させた。反応後、反応物をC8カラム(山村化学社製)を用いた高速逆相カラムクロマトグラフィーに付した。溶出は0.1%TFAを含むn-プロパノールを用い、n-プロパノール濃度を5%~60%に直線的に上げて行った。280nmの紫外吸収を測定して得られたピークのうち、メインピークについて(i)と同条件下に自動気相式シーケンサー(アプライドバイオシステム社製)を用いてアミノ酸配列を分析した。その結果、メインピークは(ii)のCN-2断片の一部を含む以下の配列を有するペプチドであることがわかった。

Gln-Leu-Asp-Val-Ala-
Asp-Phe-Ala-Thr-Thr-
Ile-Trp-Gln-Gln-Met-
Glu-Glu-Leu-Gly-Met-
Ala-Pro-Ala-Leu-Gln-
Pro-Thr-Gln-Gly-Ala-
Met-Pro-Ala-Phe-Ala-

AdTp(NHR₃) (日本ビオン社製: NHR₃はトリエチルアンモニウム, DMTrはジメトキシトリチルを示す) 20mgと0.2mlのビリジンを加えて真空ポンプにてカラム内を真空乾燥した。次いで、2, 4, 6-トリメチルベンゼンスルホン-3-ニトロトリアゾリド(MSNT, 和光純薬社製) 20mgと無水ビリジン 0.2mlを加えた後、カラム内を窒素ガスで置換して、室温下に45分間時々振とうさせることによってヌクレオチド樹脂とダイマーを縮合させた。反応終了後、ビリジンにてカラムを洗浄し、次いで未反応のOH基を過剰の無水酢酸-4-ジメチルアミノビリジンにてアセチル化した後、再びカラムをビリジンで洗浄した。以下同様に、(DMTr)Ip(NHR₃)、(DMTr)GpGp(NHR₃)、(DMTr)Ip(NHR₃)、(DMTr)CpTp(NHR₃)と(DMTr)TpTp(NHR₃)の等量混合物、(DMTr)ApAp(NHR₃)と(DMTr)ApGp(NHR₃)の等量混合物、(DMTr)ApGp(NHR₃)と(DMTr)GpGp(NHR₃)の等量混合物、(DMTr)GpAp(NHR₃)、(DMTr)TpGp(NHR₃)、(DMTr)ApAp(NHR₃)と(DMTr)GpAp(NHR₃)の等量混合物、(DMTr)CpAp(NHR₃)、

Ser-

実施例 4. DNAプローブの作成

(i) プローブ(1WQ)の合成

実施例 3.(iii)で得られたアミノ酸配列の中からIle-Trp-Gln-Gln-Met-Glu-Glu-Leu-Gly-Metで示される10個のアミノ酸の配列に基づいて、30個の連続するヌクレオチドを得た(図1)。図1の配列に於いて、例えば5'-末端から9位のヌクレオチドはdAおよびdGを等量含む混合物であることを示す。原料のヌクレオチドは主にダイマーを使用し、必要に応じて随時モノヌクレオチドも使用した。ガラスフィルター付きカラムに出発原料のヌクレオチド樹脂Ap-d(G)(ヤマザシ油社製) 20mgを入れ塩化メチレンにて洗浄を繰り返した後、3%トリクロロ酢酸を含む塩化メチレン溶液にて、4, 4'-ジメトキシトリチル基を脱離せしめ、次いで1mlの塩化メチレンでカラムを数回洗浄した。無水ビリジンで洗浄して溶媒を置換したのちヌクレオチドダイマー(DMTr)

(DMTr)ApAp(NHR₃)と(DMTr)ApGp(NHR₃)との等量混合物、(DMTr)GpCp(NHR₃)、(DMTr)TpGp(NHR₃)、(DMTr)Ip(NHR₃)、(DMTr)ApTp(NHR₃) [(DMTr)Ip(NHR₃)はヤマザシ油社製、その他は全て日本ビオン社製]の順で、前述の操作を繰り返すことによって縮合させた。最終段階の反応終了後、アセチル化することなしに、ビリジン、塩化メチレン、エーテルの順で樹脂を洗浄した後、乾燥させた。乾燥させた樹脂を1Mテトラメチルグアニジンおよび1Mα-ピコリンアルドキシムを含むジオキサン1ml、ビリジン 0.5ml、水 0.2mlの混合液 1.7mlに懸濁した後、一夜室温にて放置した後、100~200 μlまで減圧濃縮した。この濃縮液に少量(2~3滴)のビリジンを加えた後、濃アンモニア水2~3mlを加え55℃で6時間加温した。次いで酢酸エチルを加えて抽出分離し、得られた水層を減圧濃縮した後、50mMトリエチルアンモニウム酢酸溶液(pH 7.0)に溶解せしめてC-18カラム(1.0×15cm, Waters社製)を用いたカラムクロマトグラフィーに付

した。溶出は、50mMトリエチルアンモニウム酢酸溶液 (pH 7.0) 中10%~30%の直線濃度勾配のアセトニトリルで行い、アセトニトリル濃度が25%付近の位置で溶出されるピーク画分を減圧濃縮した。

この濃縮液に80%酢酸を加えて室温下に30分間放置した後、酢酸エチルを加えて抽出・分離し得られた水層を減圧下に濃縮した。得られた濃縮液は、C18カラム (センシュー科学社製、SSC-ODS-272, 6φ×200mm) を用いた高速液体クロマトグラフィーに付して、さらに精製した。溶出は50mMトリエチルアンモニウム酢酸溶液 (pH 7.0) 中10%~20%の直線濃度勾配のアセトニトリルを用いて行い、10A₂₆₀units以上の収量で合成DNAが得られた。

得られたオリゴヌクレオチドはMaxam-Gilbert法 (Meth. Enzym., 65巻 499頁 (1980)) により塩基配列を調べた結果、図1に示された配列を有していることが確認された。

(ii) プローブ(A)の合成

アプライドバイオシステム社のDNA合成機380Aにより、自動合成を行った。この方法はCaruthers等の記載した原理 (J. Am. Chem. Soc., 103巻3185頁 (1981)) に基づいており、ホスホアミダイト法と称されている。

5' のジメトキシトリチル基 (DMTr) を脱保護したdG-S (Sは支持体) にテトラゾールで予め活性化した (DMTr)-dTのホスホアミダイト体を縮合させた後、未反応の水酸基をアセチル化し、次いで水存在下でヨウ素酸化を行ってリン酸体へ導いた。DMTr基を脱保護し、以後同様に縮合を繰り返して図1に示される如き配列の24個のヌクレオチドを合成した。得られたヌクレオチドを支持体から開裂せしめ脱保護した後、C18カラム (センシュー科学社製SSC-ODS-272) を用いた逆相系高速液体クロマトグラフィーにて精製した。

実施例 5. CHU-2細胞の培養とmRNAの精製

1) CHU-2細胞の培養と細胞の回収

樹立されたCHU-2細胞を150cm²の培養フラ

実施例 3. (iii) で得られたアミノ酸配列の中からMet-Pro-Ala-Phe-Alaで示される5個のアミノ酸の配列に基づいて14個の連続するヌクレオチドを得た。(図1)

合成は、プローブ (IWQ) と同様な方法で行いヌクレオチド樹脂AP-d (T) (ヤマサ醤油社製) に (DMTr)CpAp(NHR₃) : (DMTr)GpGp(NHR₃) : (DMTr)CpAp(NHR₃)、(DMTr)CpTp(NHR₃)、(DMTr)CpGp(NHR₃) および (DMTr)CpCp(NHR₃) の等量混合物 : (DMTr)ApGp(NHR₃)、(DMTr)TpGp(NHR₃)、(DMTr)GpGp(NHR₃) および (DMTr)CpGp(NHR₃) の等量混合物 : (DMTr)ApAp(NHR₃) : (DMTr)CpAp(NHR₃) と (DMTr)CpGp(NHR₃) の等量混合物 (DMTr)Gp(NHR₃) (いずれも日本ゼオン社製) の順に縮合させて約10A₂₆₀unitsの合成DNAを得た。得られたオリゴヌクレオチドの塩基配列をMaxam-Gilbert法により調べたところ図1に示された塩基配列を有していることが確認された。

(iii) プローブ(LC)の合成

スコ2本に完全に密に増殖させた後、これをウシ胎児血清を10%含有するRPMI 1640培養液500mlに浮遊させたのち、1580cm²のガラス製ローラーボトル (Belco社製) に移し、0.5r.p.m.の速度で4日間回転培養を行った。細胞がローラーボトルの内壁に完全に密に増殖した時点で、ローラーボトルから培養液を除き、あらかじめ37℃に加温したEDTAを0.02%含む生理食塩水100mlを加え、37℃で2分間加温後、ピペット操作にて細胞をはく離せしめた。得られた細胞懸濁液を1500r.p.m.10分間の遠心にて細胞ペレットを得る。細胞をEDTAを含まない生理食塩水5mlに再び懸濁し、1500r.p.m.10分間遠心にて細胞ペレットを得た (湿重量約0.8g)、このようにして得られた細胞はRNA抽出操作を行うまで-80℃にて凍結保存する。

2) mRNAの精製

上記の如くして得られたCHU-2細胞からのmRNAの単離は本質的に "Molecular cloning" (Maniatis等, Cold Spring Harbor, 196頁

(1982)]に記載されているようにして実施した。凍結保存されていたCHU-2細胞(湿重量 3.8 g)に20%の6Mグアニジン溶液(6Mグアニジンチオシアナート, 5mMクエン酸ナトリウム(pH 7.0), 0.1M β -メルカプトエタノール, 0.5%ザルコシル硫酸ナトリウム)に懸濁し、Vortexミキサーにて2~3分よく混合した後、18 Gの注射針を装てんした20%容の注射器を用いて10回吸入排出を繰り返した。ベックマン社製SW40Tiローターに合うポリアロマー製の遠心チューブに6%の5.7M CsCl-0.1MEDTA, (pH 7.5)を先に加えておき、チューブが満たされるように上述の細胞が壊れて粘濁になったグアニジン溶液約6%を重層した。このようにして調製された遠心チューブ4本を30,000r.p.m., 20℃で15時間遠心した後、得られたペレットを少量の70%エタノールを用いて3回洗浄した。

各々のチューブから得られたペレットを合して550 μ lの水に溶解せしめNaCl濃度が0.2Mとなるように調整したのち、フェノールクロロ

ホルム(1:1)処理、クロロホルム処理後、2.5倍容量のエタノールを加えてエタノール沈澱を行い全RNAを得た。(湿細胞 3.8gより全RNA約10.1mgを得た。)全RNAからポリ(A⁺)-RNAの精製は以下の如く行った。この方法はmRNAが3'末端にポリA鎖を付加していることを利用したアフィニティークロマトグラフィーである。オリゴ(dT)-セルロース(P-L Biochemicals社製, Type 7)を用い、吸着は全RNAを吸着緩衝液(10 mMトリス-塩酸(pH 7.5), 0.5M NaCl, 1mM EDTA, 0.1%SDS溶液を含む。)に溶解し、65℃で5分間加熱した後、同溶液にて充てんされたオリゴ(dT)-セルロースカラムに通過させて行い、溶出はTE溶液(10mMトリス-塩酸(pH 7.5), 1mM EDTAを含む。)で行った。未吸着通過液は再び同カラムに通して同様に溶出操作を行い、1回目の溶出液と混合した。このような操作を用いて、ポリ(A⁺)-RNA 400 μ gを得た。このようにして調整したmRNAをSchleif

とWensinkの実験技術書(Practical Methods in Molecular Biology, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, (1981))中に記載されている方法と同様の操作で、ショ糖密度勾配遠心法によりサイズ画分した。

すなわち、SW40Tiローター(Beckman社製)用チューブに5%~25%のショ糖密度勾配を作る。ショ糖溶液は0.1M NaCl, 10mMトリス-塩酸, (pH 7.5), 1mM EDTA, 0.5% SDSの溶液にそれぞれ5%, 25%の割合いでRNaseフリーのショ糖(Schwarz/Mann社製)を含んでいる。

上記で述べた如き方法で調製したmRNA(ポリ(A⁺)-RNA) 800 μ gを200 μ l~500 μ lのTE溶液に溶解せしめ、65℃で5分間加熱後急冷した後、ショ糖密度勾配液の上にのせる。30000r.p.m.にて20時間遠心後0.5%ずつの分画を集め260nmの吸光度を測り、同様に行った標準RNA(28S, 18S, 5SのリボソームRNA)から分画されたRNAのサイズを決めると同時に各

分画のG-CSF活性をアフリカツメガエル(Xenopus laevis)の卵母細胞系を用いて調べた。すなわち各分画のmRNAを1 μ g/ μ lの濃度の水溶液に調製し、ツメガエル(生後約1年)から取り出した卵母細胞1個に50ngのmRNAの割合いで注入した後、96穴のマイクロタイタープレートの1穴に卵母細胞を10個ずつ入れ、それぞれ100 μ lのバース培地(88mM NaCl, 1mM KCl, 2.4mM NaHCO₃, 0.82mM MgSO₄, 0.33mM Ca(NO₃)₂, 0.41mM CaCl₂, 7.5mMトリス-塩酸(pH 7.6), ペニシリン10mg/l, ストレプトマイシン硫酸10mg/l)中で48時間室温で培養した後上清を回収し、濃縮・精製してG-CSF活性を測定する。

この結果、15~17S画分にG-CSF活性が認められた。

実施例 6. cDNAの合成(PBR系cDNAライブラリーの構築)

前述の方法で得られたポリ(A⁺)-RNAが

らLand等の方法[Nucleic Acids Res. 9巻 2251頁(1981)]に基づき、GublerとHoffmanの方法[Gene. 25巻 263頁(1983)]を加味してcDNAを得た。

1) 1本鎖cDNAの合成

エッペンドルフ社製 1.5mlチューブに以下の如くの順序で試薬を入れる。80 μ lの反応緩衝液(500mM KCl, 50mM MgCl₂, 250mM トリス-塩酸, pH 8.3), 20 μ lの200mMジチオスレイトール, 32 μ lの12.5mM dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTPを各々12.5mM含む), 10 μ lの α -³²P-dCTP(アマシャム製, PB 10205), 32 μ lのオリゴ(dT)₁₂₋₁₈(P-L Biochemicals社製, 500 μ g/瓶), 20 μ lのポリ(A⁺)-RNA(2.1 μ g/ μ l), 蒸留水 206 μ lの計 400 μ lの反応液を65℃で5分間加熱後、42℃で5分間加温する。この反応液に逆転写酵素(宝酒造製) 120単位を加え、さらに42℃、2時間反応させた後、RNaseインヒビター(Bethesda Research

Laboratories社製) 2 μ l、20 μ lのTE溶液、16 μ lの100mMピロリン酸ナトリウム、48単位(4 μ l)の逆転写酵素を追加して、今度は46℃2時間反応せしめた。0.5M EDTA 8 μ l、10% SDS 8 μ lを加えて反応を停止させた後、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈澱(2回)を行い一本鎖cDNAを得た。

2) 1本鎖cDNAへのdC-鎖付加

上記で得られた一本鎖cDNAを60 μ lの蒸留水に溶解後、60 μ lのdC-鎖付加緩衝液(400mMカコジル酸カリウム; 50mMトリス-塩酸(pH 6.9); 4mMジチオスレイトール; 1mM CoCl₂; 1mM dCTPに加え、37℃で5分間加温した。この反応液にターミナルトランスフェラーゼ(27unit/ μ l, P-L Biochemicals社製) 3 μ lを加えて37℃で2.5分間反応した後、フェノール-クロロホルム処理(1回)、及びエタノール沈澱(2回)を行い、100mM NaClを含むTE溶液40 μ lに溶解せしめた。

3) 2本鎖cDNAの合成

上記40 μ lのDNA溶液に4 μ lのオリゴG)₁₂₋₁₈(200 μ g/瓶, P-L Biochemicals社製)を加え65℃5分間、続いて42℃で30分間加温した後、反応液を0℃に保った。この反応液に緩衝液80 μ l(100mMトリス-塩酸, pH 7.5, 20mM MgCl₂, 50mM (NH₄)₂SO₄, 500mM KCl), 4 μ lの4mM dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTPを各々4mM含む), 60 μ lの1mM β -NAD、及び210 μ lの蒸留水、20 μ lのE. coli DNAポリメラーゼI(宝酒造社製)、15 μ lのE. coli DNAリガーゼ(宝酒造社)、15 μ lのE. coli RNase H(宝酒造社)を加え12℃にて1時間反応させた後、さらに4 μ lの4mM dNTPを追加し、25℃で1時間反応して、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈澱(1回)を行って、約8 μ gの2本鎖cDNAを得た。この2本鎖cDNAをTE溶液に溶解せしめ1.2%アガロースゲル電気泳動を行い、約560塩基対(bp)~2キロ塩基対(Kbp)の大きさに相当する部

分をワットマンDE81(ワットマン社製)に吸着させ溶出回収したところ、約0.2 μ gが回収された。

4) 2本鎖cDNAへのdC-鎖付加

上記の如く得られた2本鎖cDNAを40 μ lのTE溶液に溶解し、2)の項で述べたdC-鎖付加緩衝液8 μ lを加え37℃で2分間加温した後、1 μ lのターミナルトランスフェラーゼ(27unit/ μ l)を加えて37℃で3分間反応せしめた。反応液を直ちに0℃に冷却し0.5M EDTA 1 μ lを加えて反応を停止した後、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈澱を行い、得られた沈澱をTE溶液10 μ lに懸濁した。

5) pBR系cDNAライブラリーの構築

市販のオリゴ(dG)鎖付加pBR 322ベクター(ベセスダリサーチラボラトリーズ社製、10ng/ μ l) 4 μ lと上記dC-鎖付加2本鎖cDNA 2 μ lを75 μ lの0.1M NaClを含むTE溶液の中でアニールさせた。アニールは65℃、5分加温した後40℃にて2時間加温、その後、室温にな

るまで放置して行った。

一方、Maniatisらの実験書[Molecular cloning, Cold Spring Harbor, 249頁(1982)]に記載されている方法等を用いて大腸菌X1776株からコンピテント細胞を調製し、上記アニールされたプラスミドにより形質転換を行い、トランスフォーマント(形質転換体)が得られた。

実施例 7. cDNA合成(λファージ系ライブラリーの構築)

1) 1本鎖cDNAの合成

実施例5で述べた方法に従って、3.8gの凍結保存CHU-2細胞から2回オリゴ(dT)セルロースカラムによる精製を経て400μgのポリ(A⁺)-RNAを得た。

このポリ(A⁺)-RNA12μgを溶解したTE溶液10μlを10μgのアクチノマイシンD(シグマ社製)を含む反応チューブに入れた後、以下の順序で試薬類を加えた: 20μlの逆転写緩衝液(250 mMトリス-塩酸(pH 8.3), 40mM MgCl₂, 250 mM KCl) 20μlの5mM

-NAD: 1.0μlのα-[32p] dATP (10 μCi/μl); 0.2μl E. coli DNAリガーゼ(60unit/μl 宝酒造社製); 5.0μlのE. coli DNAポリメラーゼI (New England Biolabs社, 10unit/μl); 0.1μlのRNase H (60unit/μl 宝酒造社製); 28.7 μlの蒸留水。

反応液を14℃で1時間インキュベートした後、室温にもどして、さらに1時間インキュベートした。次いで5μlの0.5M EDTAと1μlの20% SDSを加えて反応を停止させ、フェノール-クロロホルム処理、エタノール沈澱を行った。得られたDNAを0.5mM EDTA 20μlに溶解せしめ、3μlのKlenow緩衝液(500mMトリス-塩酸(pH 8.0), 50mM MgCl₂), 3μlの5mM dNTP, 及び水4μlを加えて反応液を調製した後、1μlのDNAポリメラーゼ(Klenow断片)(宝酒造社製)を加えて30℃15分インキュベートした。

この反応液に70μlのTE溶液を加えて希釈し、

dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTPを各々5mM含む)、20μlのオリゴ(dT) 12-18 (0.2μg/μl P-L Biochemicals社製)、1μlの1Mジチオスレイトール、2 μlの30unit/μlのRNase(プロメガバイオテック社)、10μlの逆転写酵素(10unit/μl 生化学工業社製)、1μlのα-[32p] dATP (10μCiアマシャム社製)、16μlの水で計 100μlの液量の反応液になる。反応液を42℃で2時間保った後、5μlの0.5M EDTA及び1μlの20% SDSを加えて反応を停止した。フェノール-クロロホルム(100μl)処理、エタノール沈澱(2回)を行って約4μgの1本鎖 cDNAを得た。

2) 2本鎖cDNAの合成

上記の如く得られたcDNAを29μlのTE溶液に溶解し以下の順序で試薬類を加えて反応液とした: 25μlのポリメラーゼ緩衝液(400 mM Hepes (pH 7.6); 16mM MgCl₂; 63mMのβ-メルカプトエタノール; 270mM KCl); 10μlの5mM dNTP; 1.0μlの15mM β

さらに5μlの0.5M EDTA, 1μlの20% SDSを加えて反応を停止した。反応液をフェノール-クロロホルム処理し、エタノール沈澱を行って約8μgの2本鎖cDNAを得た。

3) 2本鎖cDNAのメチル化

2)の項で合成した2本鎖cDNAの水溶液30μl、メチル化緩衝液(500mMトリス-塩酸(pH 8.0), 50mM EDTA) 40μl, SAM溶液(800μM S-アデノシル-L-メチルメチオニン(SAM), 50mM β-メルカプトエタノール) 20μl, 水 100μlを加えた混合液にEcoRIメチラーゼ(New England Biolabs社, 20unit/μl) 15μlを加えて全反応液を200μlとし、37℃2時間インキュベートした。フェノール処理、エーテル処理を行った後、エタノール沈澱を行ってDNAを回収した。

4) EcoRIリンカーの付加

上記メチル化された2本鎖DNA約1.2μgにリガーゼ緩衝液(250mMトリス-塩酸(pH 7.5), 100mM MgCl₂) 1.5μl, あら

かじめリン酸化されたEcoRIリンカー 0.5 μ l (10 mer, 宝酒造社製), 1.5 μ l の10mM ATP, 100mMジチオスレイトール 1.5 μ l, 2 μ l のH₂Oを加え、反応液を15 μ l として T₄ DNAリガーゼ (3.4u/ μ l, 宝酒造社) 0.7 μ l 加えて4℃で一晩反応させた後、65℃にて10分間加熱しリガーゼを失活させた。この反応液をさらに 100mMトリス-塩酸 (pH 7.5), 5mM MgCl₂, 50mM NaCl, 100 μ g/ml のゼラチンの濃度で全液量が50 μ l になるように調製した後、EcoRI (10unit/ μ l) 3.5 μ l 加え、37℃、2時間反応させた。次いで 0.5MのEDTA 2.5 μ l, 20% SDS 0.5 μ l を加えた後フェノール-クロロホルム処理を行いエタノール沈澱によりDNAを回収した。この後 Ultrogel AcA34 (LKB社製) のゲル濾過法あるいはアガロースゲル電気泳動法にて未反応の EcoRIリンカーを除去し、リンカー付加2本鎖cDNA約 0.5~0.7 μ g を回収した。

5) 2本鎖cDNAと λ gt10ベクターの結合

すなわち、541濾紙にコロニーを移した後、クロラムフェニコール (250 μ g/ μ l) を含んだ寒天培地に移し、さらに37℃で一晩放置した。

541濾紙を取り出した後、室温下で 0.5N NaOH 溶液を浸した濾紙上に3分間放置し、これを2回繰り返した。以下同様な操作を 0.5Mトリス塩酸 (pH 8) 溶液を用いて3分間、2回行ない、さらに4℃下に 0.05 Mトリス塩酸 (pH 8) 溶液で3分、1.5mg/mlのリゾチーム液 (0.05 Mトリス塩酸 (pH 8), 25%ショ糖を含む) で10分間、次いで37℃下に1×SSC (0.15 M NaCl および 0.015クエン酸ナトリウム) 溶液で2分間、200 μ g/mlプロテアーゼKを含む1×SSC溶液で30分、再び室温下に1×SSC溶液で2分間、95%エタノール溶液で2分間、2回行った後、541濾紙を乾燥させた。得られた乾燥 541濾紙を室温下にフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1, 100mMトリス塩酸 (pH 8.5), 100mM NaCl, 10mM EDTAで平衡化したもの) 溶液に30分間浸した。

上記のリンカー付加2本鎖cDNAを 2.4 μ g の予じめEcoRI処理した λ gt10ベクター (ベクタークローニングシステム社)、リガーゼ緩衝液 (250 mMトリス塩酸, 100 mM MgCl₂) 1.4 μ l, 蒸留水 6.5 μ l を加えて、42℃、15分間処理した後10mM ATP 1 μ l, 0.1Mジチオスレイトール 1 μ l, T₄ DNAリガーゼ 0.5 μ l を加え全量を15 μ l とした後、12℃で一晩反応させた。

6) インビトロパッケージング

上記5)で得られた組換え体DNAの約1/3 をインビトロパッケージングキット (プロメガ バイオテック社) を用いてパッケージングし、ファージブランクを得た。

実施例 8. プロープ (IWQ) によるpBR系ライブラリーのスクリーニング

コロニーの成育した寒天培地上にワットマン 541濾紙をのせ37℃で2時間放置した。以下、TaubとThompsonの方法 [Anal. Biochem. 126巻 222頁(1982)] に準じて濾紙を処理した。

以下同様の操作を5×SSC溶液で3分間、3回次いで95%エタノール溶液で3分間、2回行った後、濾紙を乾燥させた。

プロープ (IWQ) を常法 (Molecular cloning を参照) に従って³²Pを用いて放射標識した後、Wallace 等の方法 (Nucleic Acids Res. 9巻 879頁(1981)) に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行った。6×NET [0.9M NaCl, 0.09 Mトリス塩酸 (pH 7.5), 6mM EDTA], 5×Denhardt溶液, 0.1% SDS, 0.1mg/ml変性DNA (仔牛胸腺DNA) を含むハイブリダイゼーション緩衝液中で65℃、4時間、プレハイブリダイゼーションを行った後、放射標識化したプロープ (IWQ) 1×10⁶ cpm/mlを含む前記ハイブリダイゼーション緩衝液を用いて56℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。反応終了後 541濾紙を室温下に 0.1% SDS を含む6×SSC 溶液で30分、2回および56℃、1.5分間洗滌した後、オートラジオグラフィを行った。

シグナルの出たクローンよりプラスミドを分離

した後、プローブ (1WQ) を用いてサザンブロッティングを行った。ハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィーは前述と同一の条件で行なった。

同様にプローブ (A) を用いてサザンブロッティングを行った。ハイブリダイゼーションは前述のハイブリダイゼーション緩衝液を用い、49℃で1時間行い、39℃まで徐冷後さらに39℃で1時間行なった。反応終了後、ニトロセルロースフィルターを0.1% SDSを含む6×SSCで室温下に30分で2回洗滌し、次いで39℃で3分間洗滌した後、オートラジオグラフィーを行なった。

この結果、1個のクローンがポジティブなものとして得られ、ジデオキシ法により塩基配列を決定したところ図2に示した如く、プローブ (1WQ) 及びプローブ (A) 部分を含む308塩基対よりなるDNAであることが判明し、このインサートを含むpBR322由来プラスミドをpHCS-1と命名した。

実施例9. pHCS-1由来DNAプローブに

0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性DNA (鮭精巣DNA)、及び0.1% SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液中で42℃にて一晩プレハイブリダイゼーションを行い、ニックトランスレーションにより放射標識化したpHCS-1プローブ 4×10^5 cpm/ μg を含むハイブリダイゼーション緩衝液 (5×SSC, 5×Denhardt溶液, 20mMリン酸緩衝液 (pH 6.0), 50%ホルムアミド, 0.1% SDS, 10%デキストラン硫酸, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性DNA (鮭精巣DNA) の混合液) で42℃にて20時間ハイブリダイゼーションを行った。

ニトロセルロース濾紙を室温下に0.1% SDSを含む2×SSCで20分間洗滌し、次いで44℃で、0.1% SDSを含む0.1×SSCで30分間、さらに室温下で0.1×SSCで10分間洗滌した後、オートラジオグラフィーで検出した。

その結果、5個のポジティブなクローン (G1~5) が得られた。そこで、得られたクローンのうち完全長cDNAを含むと思われるクローンのDNA塩基配列をジデオキシ法にて調べたところ

よる λ ファージ系ライブラリーのスクリーニング

BentonとDavisの方法 [Science 196巻, 180頁, (1977)] に準じてブラークハイブリダイゼーションを行った。実施例8で得られたpHCS-1をSau3AおよびEcoRIで処理して約600塩基対のDNA断片を得、このDNA断片を常法に従いニックトランスレーションにより放射標識した。ファージブラークの生じた寒天培地上にニトロセルロース濾紙 (S&S社) をのせてファージを移し、0.5M NaOHにてDNAを変性させ、以下の順序で濾紙を処理した。0.1M NaOH, 1.5M NaClで20秒続いて0.5Mトリス塩酸 (pH 7.5), 1.5M NaClで20秒2回、最後に120mM NaCl, 15mMクエン酸ソーダ, 13mM KH_2PO_4 , 1mM EDTA, pH 7.2で20秒処理した。

次いで濾紙を乾燥し、80℃で2時間加熱してDNAを固定した。5×SSC, 5×Denhardt溶液, 50mMリン酸緩衝液, 50%ホルムアミド、

図3に示される如き塩基配列が得られた。そこでこのcDNAを λ gt10ベクターより切りだし、pBR327 [Soberon等; Gene 9巻 287頁 (1980)] とEcoRI部位で結合させ、プラスミドとして大量調製した。このプラスミドをpBRG4と称する。

実施例10. pBRG4由来DNAプローブおよびプローブ (LC) による λ ファージ系ライブラリーのスクリーニング

実施例9で用いたBentonとDavisの方法 (前出の文献を参照) に準じてブラークハイブリダイゼーションを行った。ファージブラークの生じた寒天培地上にニトロセルロース濾紙 (S&S社製) をのせてファージを移し、0.5M NaOHにてDNAを変性させ、以下の順序で濾紙を処理した。

0.1M NaOH, 1.5M NaClで20秒、続いて0.5Mトリス塩酸 (pH 7.5), 1.5M NaClで20秒2回、最後に120mM NaCl, 15mMクエン酸ソーダ, 13mM KH_2PO_4 , 1mM EDTA, (pH 7.2) で20秒処理した。

次いで濾紙を乾燥し、80℃で2時間加熱してDNAを固定した。このようにして同一の濾紙を2枚作製し、pBRG4由来DNAプローブとプローブ(LC)によるスクリーニングにそれぞれ供した。

pBRG4由来DNAプローブによる場合は、pBRG4をEcoRIで処理して約1500塩基対のDNA断片を得、このDNA断片を常法に従ってニックトランスレーションにより放射標識した。上記濾紙を5×SSC、5×Denhardt溶液、50mMリン酸緩衝液、50%ホルムアミド、0.25 mg/mlの変性DNA(鮭精巣DNA)、及び0.1%SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液中出42℃にて一晩、プレハイブリダイゼーションを行い、上記の放射標識した約1500塩基対のDNAプローブ(約 1×10^6 cpm/ml)を含むプレハイブリダイゼーション緩衝液[5×SSC、5×Denhardt溶液、20mMリン酸緩衝液(pH 6.0)、50%ホルムアミド、0.1%SDS、10%デキストラン硫酸、0.1mg/mlの変性DNA(鮭精巣DNA)の混合液]で42℃にて20時間ハイブリダイゼーションを行った。

濾紙を乾燥した後オートラジオグラフィーで検出した。

このようにして行ったスクリーニングに於いて、2つのプローブの両方にポジティブなクローンを選別し、そのうち完全長のcDNAを含むと思われるクローンの塩基配列をジデオキシ法にて調べたところ、図4(A)に示される如き塩基配列が得られた。そこでこのcDNAをλgt10ベクターより切りだし、pBR 327とEcoRI部位で結合させ、プラスミドpBRV2を得た。

実施例11. [tacプロモーター含有ベクターを用いた例]

1) 組換えベクターの構築

① ベクターの調製

tacプロモーター含有ベクターpKK 223-3(ファルマシア社製)5μgを30μlの反応液(50mM Tris-HCl、7mM HgCl₂、100mM NaCl、7mM 2-メルカプトエタノール)中、EcoRI(宝酒造社製)8単位で37℃、2時間処理した。

ンを行った。ニトロセルロース濾紙を室温下に、0.1%SDSを含む2×SSCで20分間洗滌し、次いで44℃で、0.1%SDSを含む0.1×SSCで30分間、さらに室温下で0.1%SSCで10分間洗滌した後、オートラジオグラフィーで検出した。

プローブ(LC)の場合は、濾紙を0.1%SDSを含む3×SSCで、65℃にて2時間前処理した後、6×NET、1×Denhardt溶液、100μg/mlの変性DNA(鮭精巣DNA)を含む溶液中、65℃で2時間、プレハイブリダイゼーションを行った。

放射標識したプローブ(LC)(2×10^6 cpm/ml)を含むプレハイブリダイゼーション緩衝液[6×NET、1×Denhardt溶液、100μg/ml変性DNA(鮭精巣DNA)]で63℃にて一晩ハイブリダイゼーションを行った後、ニトロセルロース濾紙を室温下に、0.1%SDSを含む6×SSCで20分間洗滌し、この洗滌を3回行った後、0.1%SDSを含む6×SSCにて、63℃で2分間洗滌した。

次いで、アルカリホスファターゼ(宝酒造社製)3μlを加え60℃、30分間処理し、常法に従いフェノール処理3回、エーテル処理及びエタノール沈澱を行ってDNA断片を回収した。

このDNAを50mM Tris-HCl、5mM MgCl₂、10mM DTT、1mMのdATP、dCTP、dGTP、TTPからなる50μlの混合液に溶解し、大腸菌DNAポリメラーゼI-Klenow断片(宝酒造社製)3μlを加えて14℃、2時間反応せしめ、末端をプラントエンド(blunt end)にした。

② 合成リンカーの調製

合成リンカー、CGAATGACCCCCCTGGGCC及びCAGGGGGGTTCATTCGの配列を有するオリゴヌクレチオド3μgを50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、10mM 2-メルカプトエタノール、1mM ATPからなる反応液40μl中でT₄ポリヌクレチオドキナーゼ4単位存在下、37℃、60分間反応せしめ、リン酸化した。

次いで該リン酸化オリゴヌクレチドを夫々0.2 μg を 100mM NaClを含むTE (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) 20 μl に溶解し、65℃、10分間処理した後、室温まで徐冷することによりアニーリングを行った。

③ G-CSFのcDNA断片の調製

実施例10で得た図4(A)で示すcDNAを含有するpBRV2 60 μg を6mM Tris-HCl、6mM MgCl_2 、6mM 2-メルカプトエタノールからなる反応液 200 μl 中、制限酵素ApaI (New England Biolabs 社製) 100 単位、DraI (宝酒造社製) 50単位で37℃、3時間処理し、1.2%アガロースゲル電気泳動にて約590bpのApaI-DraI断片約2 μg を回収した。

④ 上記各断片の連結

①、②、③各断片を夫々約 0.1 μg とし、20 μl の連結反応液 (66mM Tris-HCl、6.6mM MgCl_2 、10mM DTT、1mM ATP) に溶解しT4 DNAリガーゼ 175単位を

これから、1%アガロースゲル電気泳動にて、約4Kbpの断片約49 μg と約 1.2Kbpの断片約11 μg を回収した。

上記の断片のうち、まず約4Kbpの方を前記のTE緩衝液 100 μl に溶解し、アルカリホスファターゼ (宝酒造社製) 5 μl と60℃、60分間反応せしめ脱リン酸化した。

残りの約 1.2Kbpの断片の方は緩衝液 (10mM Tris-HCl、10mM MgCl_2 、6mM KCl、1mM DTT) 20 μl に溶解し、制限酵素MboII (New England Biolabs 社製) 20単位で37℃、一晩処理した。

次いで、4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約200bpのBamHI-MboII断片約 0.9 μg と約310bpのMboII-BamHI断片約 1.9 μg を回収した。

② 合成リンカーの調製

合成リンカーTAAGGAGAATTTCATC GATおよびTCGATGAATTCTCCTTAGを実施例11の②と同様にしてリン酸化しアニ

加えて4℃で一晩反応し組換えベクターを得た。

2) 形質転換

上記④で得られた組換えベクターを含む反応液 20 μl を用いて塩化ルビジウム法 (前出T. Maniatis等「Molecular cloning」P252(1982) 参照) によりE.coli JM105 株を形質変換した。得られた形質転換株はアンピシリン耐性のコロニー培養液よりプラスミドを分離し、制限酵素BamHI、AccII、ApaIで処理したところ目的の形質転換株であることが確認できた。

実施例12. [P_L プロモーター含有ベクターを使用した例]

1) 組換えベクター構築

① ベクターの調製

P_L プロモーターを含むベクターpPL-lambda (ファルマシア社製) 100 μg を制限酵素BamHI 50単位で反応液 (10mM Tris-HCl、pH7.6、7mM MgCl_2 、100 mM NaCl、10mM DTT) 100 μl 中、37℃、一晩処理した。

ーリングし、合成S/Dリンカーを得た。

③ 発現用ベクターの調製

上記①で調製した約4Kbp断片 0.1 μg 及びO_L P_L 領域を有するBamHI-MboII断片、tL₁ 領域を有するMboII-BamHI断片夫々 0.05 μg とアニールした合成S/Dリンカー 0.1 μg を40 μl の反応液 (66mM Tris-HCl、6.6mM MgCl_2 、10mM DTT、1mM ATP) 中、T₄ DNAリガーゼ (宝酒造社製) 175単位存在下12℃、一晩反応せしめた。

この反応液20 μl を用い、E. coli N99cI⁺ 株 (ファルマシア社製) をCaCl₂ 法 (前出の「Molecular cloning」参照) にて形質転換した。

該形質転換株を培養し、そのアンピシリン耐性のコロニーの培養液よりプラスミドを分離して、制限酵素EcoRI、BamHI、SmaIで処理したところ目的のプラスミドであることが確認された。

次に、このプラスミドを2 μg とし、20 μl の緩衝液 (10mM Tris-HCl、6mM

HCl、6mM MgCl₂、50mM NaCl) 中、制限酵素 ClaI (New England Biolabs 社製) 5単位を37℃、2時間反応させた後65℃10分間で失活させた。

更にその反応液1μlを20μlの前記連結反応液及びT₄ DNAリガーゼ(宝酒造社製) 175単位を用いて12℃、一晩反応した後、上記と同様にしてE. coli N99cI⁺株(ファルマシア社製)を再び形質転換した。アンピシリン耐性コロニー培養液からプラスミドを分離しEcoRI、BamHIで処理し、目的のプラスミドを確認した。

④ G-CSF発現用組換えベクター及び形質転換体の調製

③で得られた発現用プラスミドを制限酵素ClaIで処理し、末端をプラントエンドにした後実施例11と同様にしてG-CSFのcDNA断片を組み込み組換えベクターを得た。これを用い、前出のMolecular Cloningに記載されているCaCl₂法にてE. coli N4830株(ファルマシア社製)を形質転換した。なお、目的の形質転換体の確認も

③ 組換えベクターの調製

上記①で調製ベクターの断片約1μg、及び②の合成リンカー約1μgと、実施例11の③で調製したG-CSFのcDNA断片約1μgを前記の連結反応液20μl中、T₄ DNAリガーゼ(宝酒造社製) 175単位と12℃で一晩反応せしめ組換えベクターを得た。

2) 形質転換

上記③の反応液20μlを前出「Molecular cloning」の塩化ルビジウム法でE. coli DH1株に形質転換した。

実施例11と同様にしてアンピシリン耐性のコロニーからプラスミドをとり、制限酵素ApaI、DraI、NruI、PstIで目的とする形質転換体を得られていることを確認した。

実施例14. : 形質転換株の培養

1) 実施例11で得た形質転換株(Tac含有)の培養

アンピシリン25μg/皿または50μg/皿を含むルリア(Luria)培地100mlに、37℃、一晩培

養した該形質転換株の培養液1mlを加え37℃で2～3時間培養する。次いで、イソプロピルβ-D-チオガラクトシド2mMにして37℃、2～4時間培養した。

実施例13. [trpプロモータ含有ベクターを用いた例]

1) 組換えベクターの構築

① ベクターの調製

pBR 322のClaI部位にトリプトファンプロモーターを含む約330bpのHpaII-TaqI断片を挿入し作製したpOY1プラスミド10μgを10mM Tris-HCl、6mM MgCl₂、50mM NaClの反応液30μl中、制限酵素ClaI 7単位、PvuII 8単位で37℃、3時間処理した。次いで、アルカリホスファターゼ(宝酒造社製) 2μlを加え60℃、1時間反応せしめた。

これから1%アガロースゲル電気泳動により約2.6Kbpの断片を約2.5μg回収した。

② 合成リンカーの調製

合成リンカーCGCGAATGACCCCCCTGGGCC及びCAGGGGGGTTCATTCGを実施例11の②と同様にしてリン酸化し、アニーリングした。

養した該形質転換株の培養液1mlを加え37℃で2～3時間培養する。次いで、イソプロピルβ-D-チオガラクトシド2mMにして37℃、2～4時間培養した。

2) 実施例12で得た形質転換株(P_L含有)の培養

アンピシリン25μg/皿または50μg/皿を含むルリア培地100mlに28℃一晩培養した該形質転換株の培養液1mlを加え28℃で約4時間培養した。その後、これを42℃にし2～4時間培養を行った。

3) 実施例13で得た形質転換株(trp含有)の培養

0.5%グルコース、0.5%カフェミノ酸(Difco社製)、アンピシリン25μg/皿又は50μg/皿を含むM9培地100mlに37℃一晩培養した該形質転換株の培養液1mlを加えて37℃で4～6時間培養する。次いで、3-β-インドールアクリル酸(LAA) 50μg/皿を加えて37℃で4～8時間培養した。

実施例15. : 大腸菌からのG-CSFポリペプチドの回収・精製

1) 回収

実施例14で培養した形質転換株、夫々について以下の回収操作を行った。

培養液 100mlを遠心分離にかけて菌体を集め、20mM Tris-HCl (pH 7.5)、30mM NaCl 混合液5mlに懸濁させた。

次いで、各々1mM、10mM、0.2μg/mlになるように0.2Mフェニルメチルスルホニルフルオリド、0.2M EDTA、リゾチームを加え、0℃で30分間放置した。

次に凍結-融解を3回くりかえし溶菌させた。続いて8M塩酸グアニジンを用いて、最終的に6M塩酸グアニジンにした後、30,000r.p.m.、5時間の遠心分離を行い、その上澄液を取得した。

2) 精製

(i) 1)で得た上澄液を直径4.6cm、長さ90cmのUltrogel ACA54カラム(LKB社製)にて、0.15M NaClおよび0.01%ツィーン20(半井化学社製)を含む0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)を用いて流速約50ml/時間でゲル

にて溶出されるピークに活性が認められたので、このピークを集め再度同じ条件で再クロマトを行い上記と同様にしてCSAを調べたところ、やはりn-プロパノール40%の位置のピークに活性が認められたので、このピークを集め(4フラクション=4ml)凍結乾燥した。

(iii) 上記凍結乾燥粉末をn-プロパノールを40%含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液200μlに溶解し、TSK-G3000SWカラム(東洋曹達社製、7.5mm×60cm)を用いた高速液体クロマトグラフィ(HPLC)にかけた。溶出は同水溶液により0.4ml/分の流速で行い、フラクションコレクターFRAC-100(ファルマシア社製)により0.4mlずつ分取した。分取した各画分についてCSAを前記と同様にして調べ活性画分を回収し、更に分析用μ Bondapak C18カラム(4.6mm×30cm)による精製を施したのち、メインピークを回収し凍結乾燥した。

得られたタンパク質を2-メルカプトエタノールで処理してSDS-ポリアクリルアミドゲル

を経過した。次いで、前述した「CSAの測定方法(b)」により活性を示す画分をとりPM-10(アミコン社製)を用いる限外濾過器によって約5mlに濃縮した。

(ii) 上記濃縮画分にn-プロパノール(東京化成社製、アミノ酸配列決定用)を30%含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を添加し、水中に15分程度放置したのち、15,000r.p.m.10分の遠心により沈澱を除去した。次いで先のn-プロパノールおよびトリフルオロ酢酸を含む水溶液で平衡化したμ Bondapak C18カラム(Waters社製、セミ分取用、8mm×30cm)に吸着後、30~60%の直線濃度勾配のn-プロパノールを含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液で順次溶出した。高速液体クロマト装置は日立685-50型を、検出は日立638-41型検出器(いずれも日立製作所製)を用い、220nmと280nmの吸収を同時に測定した。溶出後、各画分より10μlを分取100倍希釈したのち、前述の「CSAの測定方法(b)」により活性を示す画分を調べた。この結果、n-プロパノール40%

(15.0%)電気泳動(15mV,6時間)にかけ、クマシーブルーで染色したところ目的とするG-CSFポリペプチドが単一のバンドとして確認できた。

実施例16:発現物質のG-CSF活性の検定

実施例15で得たCSF試料を前述の<参考例>CSF活性の測定方法(a)に従って検定した。この結果を表-1に示す。

表-1

	ヒト好中球コロニー数/dish
精製ヒトG-CSF (20ng)	73
実施例15で得たCSF試料 (50ng)	73
ブランク	0

実施例17:アミノ酸分析

1) アミノ酸組成の分析

実施例15で精製したCSF試料を常法により加水分解し、そのタンパク部分のアミノ酸組成を日

立 835アミノ酸自動分析装置（日立製作所社製）を用いて特殊アミノ酸分析法により分析した。この結果を表-2に示した。尚、加水分解条件は次の如くである。

- ① 6N HCl, 110℃, 24時間, 真空中
- ② 4N メタンスルホン酸 + 0.2% 3-(2-アミノエチル)インドール, 110℃, 24時間, 48時間, 72時間, 真空中試料は40% n-プロパノールと 0.1%トリフルオロ酢酸を含む溶液 (1.5 ㎖) に溶かした後、各々 0.1 ㎖をとり、乾燥窒素ガスにより乾燥させた後、①又は②の試薬を加えて真空封管し、加水分解に供した。表中、実測値は①の24時間値と②の24, 48, 72時間値の合計4回の平均値である。但し、Thr, Ser, 1/2 Cys, Met, Val, IleおよびTrpは以下の方法で算出した。（生化学実験講座、タンパク質化学Ⅱ（東京化学同人出版）を参照）Thr, Ser, 1/2 Cys, Metは②の24, 48, 72時間値の経時変化をとり、零時間に補外。Val, Ileは②の72時間値。Trpは②の24

48, 72時間値の平均値。

表-2 (アミノ酸分析表)

アミノ酸	モル%
Asp (Asp+Asn)	2.3
Thr	4.0
Ser	8.1
Glu (Glu+Gln)	15.0
Pro	7.5
Gly	8.1
Ala	11.0
1/2 Cys	2.9
Val	4.1
Met	2.0
Ile	2.2
Leu	18.8
Tyr	1.7
Phe	3.4
Lys	2.3
His	2.7
Trp	1.1
Arg	2.8

2) N末端アミノ酸分析

試料を気相式シーケンサー（アプライドバイオシステム社製）を用いてエドマン（Edman）分解し、得られたPTHアミノ酸を高速液体クロマトグラフィー装置（ベックマン・インストルメンツ社製）およびUltrasphere-ODSカラム（ベックマン・インストルメンツ社製）を用いて常法により分析した。カラム（5 μ m, 直径 4.6 mm, 長さ 250mm）を開始緩衝液（15mM酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.5, 40%アセトニトリルを含む水溶液）にて平衡化したのち、検体（20 μ l の開始緩衝液にて溶解）を注入して開始緩衝液によるイソクラティック溶出により分離を行った。流速は 1.4 ㎖/分、カラム温度は40℃に保持した。PTHアミノ酸の検出は269nm と320nm の紫外部吸収を利用した。あらかじめ標準PTHアミノ酸（シグマ社製）各 2 nmolを同一の系で分離して保持時間を決定し、被検検体の保持時間から同定を行った。

その結果、PTH-メチオニンおよびPTH-

スレオニンが検出された。

<実験例> ヒトG-CSFの感染防御効果

1. シュードモナス アエルギノーザ (Pseudomonas aeruginosa) 感染に対する防御効果

8~9週令（体重35.3 \pm 1.38g）のICR系マウス（雄）にエンドキリン（シオノギ社製、商品名）200mg/Kgを腹腔内投与した後3群に分け、その2群にヒトG-CSF（25000 u/マウス又は50000 u/マウス）を含む溶媒（1%プロパノール、5%（W/V）マウス血清アルブミン）を、そして別の1群には溶媒のみを、それぞれ24時間毎に 0.1 ㎖ずつ4回皮下投与した。4回目の投与後3時間して各々の群にシュードモナス アエルギノーザ (Pseudomonas aeruginosa) GNB-139 (3.9 $\times 10^4$ CFU/マウス) を皮下投与して感染させた。感染後21時間してさらにもう一度ヒトG-CSF（25000 u/マウス又は50000 u/マウス）を含む溶媒又は溶媒のみをそれぞれ対応する群に皮下投与した。

感染後10日目までの生存マウス数により感染防

御効果を調べた。(表-3)

(菌液の調製)

ハートインフュージョン寒天平板(Difco社製、商品名)を用いて37℃で一夜シュードモナス アエルギノーザGNB-139を振とう培養する。培養液を生理食塩水に懸濁させて調製した。

表-3 シュードモナス アエルギノーザに対する効果

群	C S F 濃 度 (u/マウス/日)	生存数/総数
溶 媒	0	0/10
CSFを含む溶媒	25000	6/10
CSFを含む溶媒	50000	8/10

表-3に示される如く本発明のヒトG-CSFは顕著な感染防御効果を有することが認められた。
(発明の効果)

以上、本発明によれば、従前入手が極めて困難であったヒトG-CSFを組換えベクター技術を

用いて大量に、しかも高品質で提供することが可能となり、これまでCSFにかけられていた数々の期待、例えば造血機構や種々の血液学的疾患の病態の解析に多大の貢献をする他、骨髄性白血病細胞の分化誘導と成熟顆粒球の機能亢進というG-CSF本来の生化学的作用を利用する治療、及び予防に使用しうるのである。

したがって放射線照射や抗癌剤投与により骨髄組織の機能が低下したり白血球が減少して、抵抗力を失った悪性腫瘍患者や、抗生物質で治療できない重症感染症患者等に対してもこれを投与することが大いに期待されているのである。

4. 図面の簡単な説明

図1はプロープ(IWQ)、プロープ(A)およびプロープ(LC)の配列を示す。

図2はpHCS-1インサートの塩基配列を示す。

図3はpBRG4のcDNAインサートの塩基配列を示す。

図4(A)はpBRV2のcDNAインサートの

塩基配列を示す。

図4(B)(I)はpBRV2cDNAから演えきしたヒトG-CSF前駆体のアミノ酸配列を示す。

図4(B)(II)はpBRV2cDNAから演えきしたヒト成熟G-CSFのアミノ酸配列を示す。

図5はpBRV2のcDNAインサートの制限酵素切断部位を示す。

図6はtacプロモーター含有ベクターの調製プロセスを示す。

図7はP_Lプロモーター含有ベクターの調製プロセスを示す。

図8はtrpプロモーター含有ベクターの調製プロセスを示す。

図 1

プロープ(IWQ)

11a Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met
5'---- ATG CCA CAA ATC CAA CAA CTG CCG ATC ----3'
 C C C C

プロープ(A)

Met Pro Ala Phe Ala
5'---- ATG CCA CCA TTT CC ----3'
 T T C
 C C
3'---- TAC GGA CCA AAA CC ----5' } 7b-7(A)
 T T C
 C C

プロープ(LC)

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr
5'---- CAG CAG AAG CTC TGT CCC ACC TAC ----3'
3'---- CTC CTC TTC GAC ACA CCG TGG ATC ----5' } 7b-7(LC)

特許出願人 中外製薬株式会社
代理人 弁理士 野崎 鉄也

4 (B)

M P L T G G A H C H A G L P A L G T G G A S V L

(I)

[illegible]

4 (A)

[illegible]

图 4 (B)

[illegible]

(II)

図 5

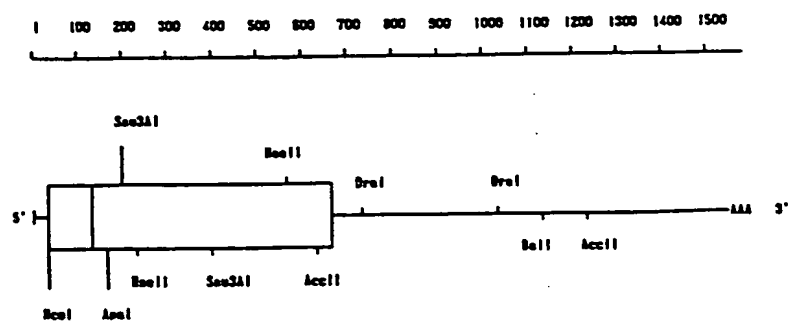
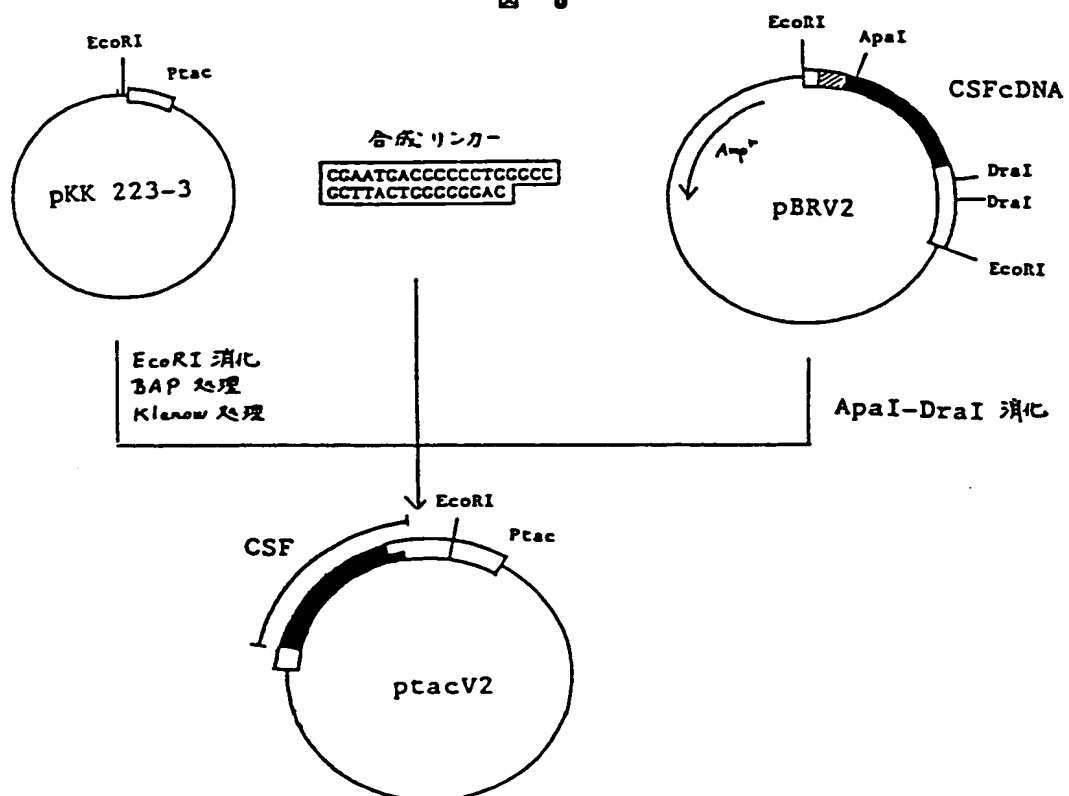
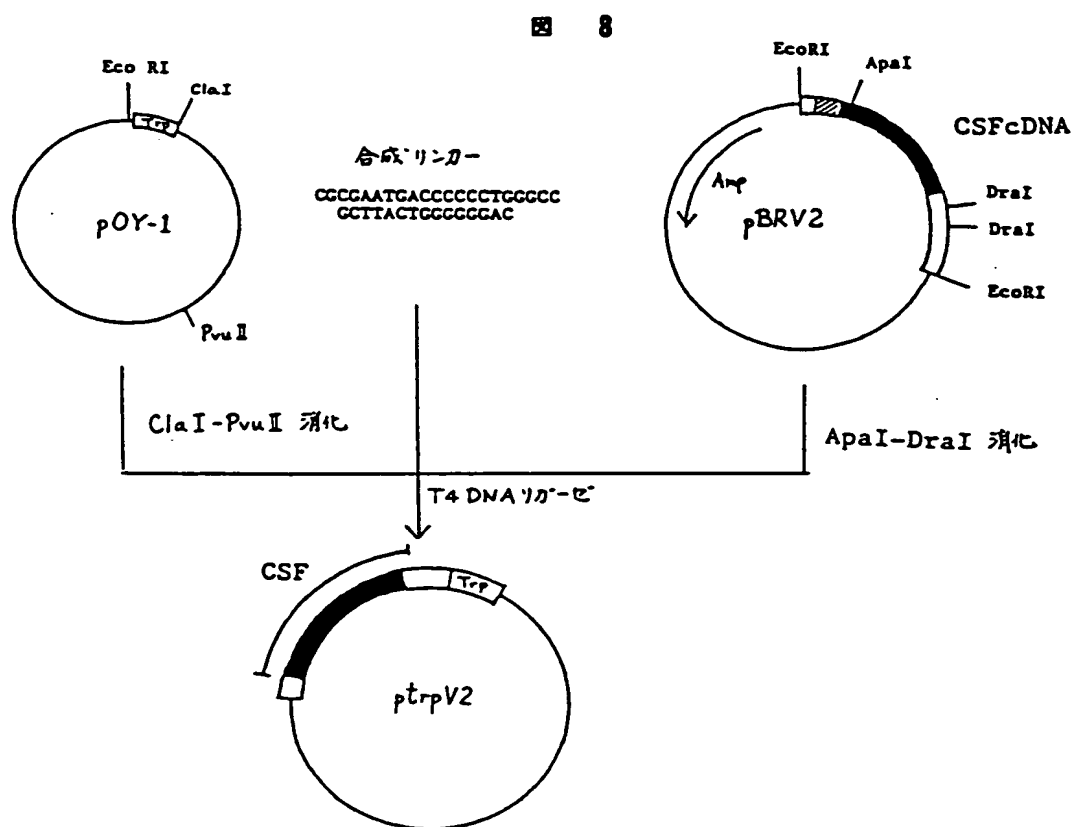
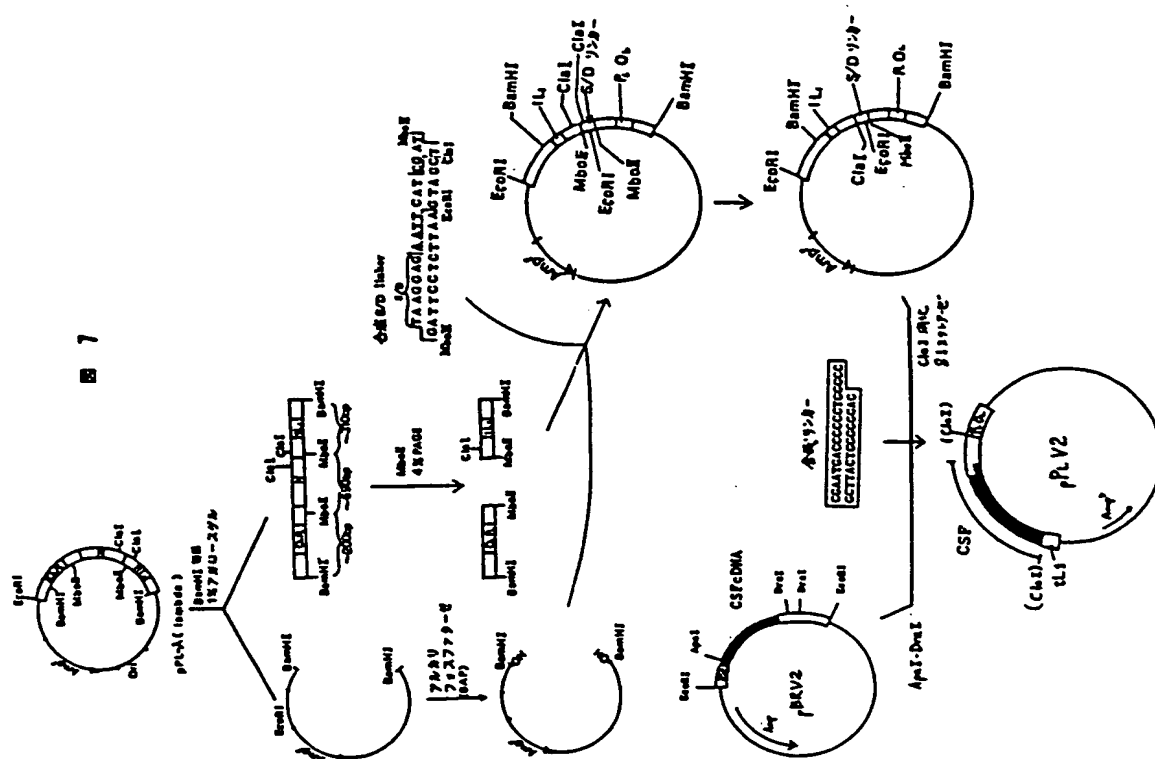


図 6





手続補正書 (自発)

昭和61年4月//日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第269455号

2. 発明の名称

新規ポリペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

東京都北区浮間5丁目5番1号

(331) 中外製薬株式会社

代表者 上野公夫

4. 代理人 郵便番号104

東京都中央区築地2丁目15番15号

セントラル東銀座802号室

電話 東京545-4570

(7549) 弁理士 野崎鉄也

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

(1) 明細書第30頁第5行~第7行「工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(FERM寄託番号P-8352)。」を「工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(FERM BP-954)。」と補正する。

(2) 同第32頁第10行「FERM寄託番号P-8453」を「FERM BP-955」と補正する。

受託番号変更届

昭和61年4月//日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第269455号

2. 発明の名称

新規ポリペプチド

3. 手続をした者

事件との関係 特許出願人

東京都北区浮間5丁目5番1号

(331) 中外製薬株式会社

代表者 上野公夫

4. 代理人 郵便番号104 電話(03)545-4570

東京都中央区築地2丁目15番15号

セントラル東銀座802号室

(7549) 弁理士 野崎鉄也

5. 旧寄託機関の名称

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

6. 旧受託番号 (1) 微工研内寄第8352号

(2) 微工研内寄第8453号

7. 新寄託機関の名称

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

8. 新受託番号 (1) 微工研条寄第954号

(2) 微工研条寄第955号

9. 添付書類の目録

(1) 新受託番号を証明する書面 各1通